



The effect of the Persian Gulf brown algae extract (*Sargassum Oligocystum*) on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro

Sajjad Masoumifard^{1,2}, Peyman Khezri^{1,2}, Habib Mohammadzadeh haji pirlo², Behnam Heshmatiayan³,
Shahram Khademvatan², Negar Manafpour⁴

1. Student Research Committee, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center & Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
4. Montgomery College, Maryland, USA, 20850

Article Information

Article history:

Received: 2017/01/22
Accepted: 2017/04/04
Available online: 2017/04/24

Article Subject:

Medical Parasitology

IJMM 2017; 11(1): 75-82

Corresponding author at:

Negar Manafpour
Dr. Shahram Khademvatan

Montgomery College, Maryland, USA,
20850

Cellular and Molecular Research
Center and Department of
Parasitology and Mycology, Faculty of
Medicine, Urmia University of
Medical Sciences, Urmia, Iran

Tel: 0989123505391

Email:

Nmanafpo@montgomerycollege.edu
khademvatan@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Leishmaniasis is a disease which caused by *Leishmania* protozoan parasitic. Plant extracts and their derived compounds, provide a rich source of medicinal compounds which is by the World Health Organization considered as a candidate drug for the treatment of many diseases. This study aimed to evaluate anti-*Leishmania* effects of Persian Gulf brown algae extract compared to meglumine control drug in vitro.

Materials and Methods: *Leishmania major* promastigotes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FBS and antibiotics, at temperature 1 ± 24 and the effect of different concentrations of Persian Gulf brown algae was evaluated by MTT assay in comparison with meglumine on *Leishmania major* promastigotes. The optical density was read by ELISA reader at wavelength of 540-630 nm. The results are expressed as IC₅₀ (Inhibitory Concentration %50).

Results: The IC₅₀ amount of extract obtained as 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *Leishmania major* after 72 hours of incubation. So that the IC₅₀ amount of meglumine control drug is 21.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *Leishmania major*.

Conclusions: The effectiveness of these extracts on these parasites is roughly equivalent meglumine and have the potential of using as an anti-*Leishmania* drug but there is need to do more tests to assess effects of this extract on *Leishmania* agents in animal models and In vivo.

KeyWords: *Leishmania major*, Promastigote, Persian Gulf brown algae, MTT, in vitro

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Masoumifard S, Khezri P, Mohammadzadeh haji pirlo H, Heshmatiayan B, Khademvatan Sh, Manafpour N. The effect of the Persian Gulf brown algae extract (*Sargassum Oligocystum*) on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 75-82



Farname Inc.

اثر عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج فارس (*Sargassum Oligocystum*) بر انگل لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در محیط آزمایشگاهی

سجاد معصومی فرد^۱، پیمان خضری^۱، حبیب محمد زاده حاجی پیرلو^۲، بهنام حشمتیان^۳،
شهرام خادم وطن^۲، نگار مناف پور^۴

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۴. کالج مونگمری، مریلند، ایالات متحده آمریکا، ۲۰۸۵۰

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: لیشمانیازیس بیماری ناشی از انگل‌های تک‌یاخته‌ای لیشمانیا می‌باشد. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آن‌ها منبع غنی از ترکیبات دارویی را فراهم می‌کنند که این داروها توسط سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان داروهای کاندید درمان بسیاری از بیماری‌ها در نظر گرفته شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج فارس در مقایسه با داروی کنترل گلوکانتیم در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار: پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک، در دمای 24 ± 1 کشت داده شد و تأثیر غلظت‌های مختلف جلبک قهوه‌ای خلیج فارس در مقایسه با گلوکانتیم بر روی پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور با روش رنگ سنجی MTT مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰-۶۳۰ نانومتر قرائت شد و سپس نتایج به‌صورت IC50 (Inhibitory concentration%50) بیان شده است.

یافته‌ها: میزان IC50 عصاره بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، برای لیشمانیا ماژور $20 \mu\text{g/mL}$ به دست آمد به طوری که میزان IC50 داروی کنترل گلوکانتیم برابر $21/8 \mu\text{g/mL}$ برای لیشمانیا ماژور است.

نتیجه‌گیری: اثربخشی این عصاره بر روی این‌گونه انگل تقریباً معادل گلوکانتیم می‌باشد و بنابراین دارای پتانسیل استفاده از آن به‌عنوان داروی ضد لیشمانیایی می‌باشد اما ضرورت انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل‌های حیوانی و *In vivo* احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، عصاره جلبک دریایی خلیج فارس، *MTT*, *in vitro*.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۲/۰۴

موضوع:

انگل‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(1): 75-82

نویسنده مسئول:

نگار مناف پور

دکتر شهرام خادم وطن

کالج مونگمری، مریلند، ایالات متحده آمریکا،
۲۰۸۵۰

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و گروه
انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه،
ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۳۵۰۵۳۹۱

پست الکترونیک:

Nmanafpo@motgomerycollege.edu
khademvatan@yahoo.com

مقدمه

این بیماری به اشکال مختلف نظیر ضایعات جلدی (سالم)، احشایی (کالاآزار) و جلدی - مخاطی بروز می‌کند. نوع جلدی به دو شکل اصلی: خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود (۴).

در حال حاضر ۱۲ میلیون نفر در ۹۸ کشور به لیشمانیا مبتلا هستند و هر ساله نزدیک به ۲ میلیون مورد جدید به این

لیشمانیازیس یک عفونت انگلی بوده و عامل به وجود آورنده آن تک‌یاخته‌ای به نام لیشمانیا می‌باشد (۱،۲).

لیشمانیا (*Leishmania*) متعلق به خانواده تریپانوزومیده (*Trypanosomidae*) می‌باشد و توسط نیش پشه‌های خاکی (*Sandfly*) از جنس *فلبوتوموس* (*Phlebotomus spp*) به انسان منتقل می‌شود (۳).

بیماری آلوده می‌شوند و بین ۲۰ تا ۵۰ هزار نفر در پی آن جان خود را از دست می‌دهند (۵).

در ایران لیشرمانیوزیس جلدی یکی از بیماری‌های بومی در اکثر نقاط کشور است و گونه‌های *لیشرمانیا ترورپیکا* و *لیشرمانیا ماژور* عامل لیشرمانیوزیس جلدی می‌باشند. متأسفانه علی‌رغم شیوع قابل‌توجه لیشرمانیوز، روش پیشگیری، کنترل و درمان قطعی برای آن وجود ندارد. (۶).

به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت برای مبارزه و کنترل این بیماری اهمیت ویژه‌ای قائل می‌باشد و آن را جزء مهم‌ترین برنامه‌های خود قرار داده است (۷).

داروهای خط اول در درمان این بیماری‌ها ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان از جمله: مگلو مین آنتیمونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) می‌باشند (۸،۹).

این ترکیبات با اثر بر روی آنزیم‌های انگلی بخصوص وقفه در آنزیم فسفوکیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات می‌شوند (۱۰).

اغلب داروهایی که برای درمان لیشرمانیوز استفاده می‌شوند، دارای یک یا چند محدودیت، از جمله اینکه مقرون به‌صرفه نیستند، از نظر نحوه مصرف و همچنین سمیت دارای مشکلاتی می‌باشند و مهم‌ترین مسئله در مورد این داروها گسترش مقاومت انگل به این داروها می‌باشد. از این‌رو نیاز به گسترش ترکیبات ضد لیشرمانیایی مؤثر، کم‌هزینه، با سمیت کم و همچنین باقابلیت تجویز از راه خوراکی، نسبت به گذشته، بیشتر احساس می‌شود (۱۱،۱۲).

با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هرگونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تأکید قرار می‌دهد (۱۳).

سازمان بهداشت جهانی در نظر دارد تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده سنتی از گیاهان برای پیدا کردن فراورده‌های دارویی جدیدتر، بهتر و کارا تر و با سمیت کمتر بکاربرد (۱۴).

در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد مؤثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آن‌ها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد، این کار به‌ویژه

در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۵).

جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند و کاربرد غذایی دارند. جلبک‌ها علاوه بر غذا می‌توانند کاربرد صنعتی، آرایشی و پزشکی نیز داشته باشند (۱۶).

جلبک‌ها به‌واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند: آگار، کاراژینان و آلژینات، دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی نیز هستند (۱۷).

جلبک‌ها منبعی غنی از ترکیبات مفید و فعال زیستی می‌باشند. تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسولوی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل شوند (۱۸).

جلبک قهوه‌ای دریای خلیج فارس از خانواده *Sargassaceae* و از جنس *Sargassum* بوده، معمولاً نام اصلی آن را *Sargassum Oligocystum Montagane* گویند (۱۹).

گونه‌های متفاوت از جنس جلبک سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت بیولوژیکی هستند که پایه آن‌ها قند فوکوز است و تاکنون خواص مهم ضد باکتریایی نظیر تأثیر روی باسیلوس سوبتیلیس، ضد ویروسی علیه هرپس سیمپلکس و ضد سرطانی از نوع روده‌ای نشان داده‌اند (۲۰).

در ایران مطالعات کمی روی خواص زیست فعال این منابع ارزشمند انجام گرفته است و مطالعات متعدد زیست‌فناوری در این زمینه ضروری می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره جلبک‌های قهوه‌ای خلیج فارس *Sargassum Oligocystum* بر انگل *لیشرمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره *Sargassum Oligocystum*

جلبک قهوه‌ای خلیج فارس از مرکز تحقیقات گیاهان دریایی بوشهر تهیه و قسمت‌های غیرقابل استفاده آن‌ها جدا شد و چند بار با آب شور دریا (آب مقطر + نمک مخصوص دریا coral pro salt) با کد ۰۵۱۲۱۰۰۱۱۴ به‌منظور پاک شدن

می‌رود، به طوری که کاهش در مقدار MTT احیاء شده نشان‌دهنده سمیت دارو برای انگل می‌باشد. برای تهیه محلول استوک MTT، ۵ mg از پودر زردرنگ MTT خریداری شده از شرکت (sigma) در یک میلی‌لیتر PBS حل و در 20°C - نگهداری شد. محلول کار به طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول استوک MTT با ۹ حجم محیط کشت RPMI دارای ۵/۲٪ FBS تهیه و استفاده شد به طوری که غلظت نهایی MTT به ۵/۰ mg/mL می‌رسید (۲۲،۲۴).

اضافه کردن پروماستیگوت ها، دارو و عصاره *Sargassum Oligocystum*

از پروماستیگوت‌های لیشمانیای موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد بودند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت Duplicate اضافه شد به نحوی که در هر چاهک تعداد ۵۰۰ هزار پروماستیگوت قرار گرفت. سپس از عصاره جلبکی و داروی گلوکانتیم در رقت‌های ۱۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک اضافه شد، علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط ۱۰۰ μL محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو است، استفاده شد. همچنین به چاهکی دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور به عنوان کنترل اضافه شد و میکروپلیت‌ها را در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط انکوباسیون قرار داده شد. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت‌ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ RPM سانتریفوژ کرده و محلول رویی را جدا و به باقیمانده ۲۰ μL از محلول MTT کار به هر چاهک اضافه شد. چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰ μL محیط کشت و فقط ۲۰ μL از محلول MTT می‌باشد. بعد از گذشت ۳-۴ ساعت انکوباسیون و سانتریفوژ کردن آن محلول رویی را جدا و کریستال‌های فورمازان را با اضافه کردن ۱۰۰ μL از محلول DMSO به هر یک از چاهک‌ها حل کرده و خوب مخلوط می‌کنیم و بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری (OD, Optical Density) را با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰-۶۳۰ نانومتر قرائت شد. سپس میزان IC_{50} (Inhibitory concentration %50) یعنی غلظتی که ۵۰ درصد از پروماستیگوت‌ها را مهار می‌کند، محاسبه گردید (۲۲،۲۵).

مشاهده تغییرات مورفولوژیک در پروماستیگوت‌های مواجه شده با عصاره

ناخالصی‌های احتمالی همراه، شست‌وشو داده شد. سپس در دمای اتاق کاملاً خشک و به صورت پودر درآمد و در یک پرکولاتور شیشه‌ای با متانول مجاور و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت روی شیکرو با مغنت مغناطیسی تکان داده شد تا مواد مؤثره آن خارج و مایع رویی با استفاده از صافی‌های ۰/۴۵ میکرونی فیلتر و محصول تا حد خروج تمام الکل با روش تقطیر در خلأ تا حد خشک شدن، تغلیظ و به صورت پودر تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری گردید. در زمان استفاده این پودر در PBS با ۱٪ DMSO حل شده (۲۱) و جهت جلوگیری از آلودگی، فیلتر شد. سپس رقت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزنی - حجمی به کمک محیط کشت RPMI تهیه شد.

تهیه داروی کنترل گلوکانتیم

از داروی مگلو مین آنتی مونات بانام تجاری گلوکانتیم ($\text{Glucantime}^{\text{®}}$) به عنوان کنترل استفاده شده است. این دارو یک آنتی موان ۵ ظرفیتی است. این دارو در دمای 4°C نگهداری شده و در زمان انکوباسیون به وسیله RPMI-1640 رقیق شد.

تهیه و کشت انگل

در این تحقیق تجربی از پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER که از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه شده استفاده شد. ابتدا پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS) و ۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{mL}$ استرپتومایسین در دمای $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ کشت داده شد. با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوت‌هایی که در محیط کشت RPMI به فاز ثابت رشد (stationary-phase) رسیدند در زیر میکروسکوپ شمارش و به تعداد $10^5 \times 5 \text{ mL}/\text{cell}$ سلول تنظیم گردید.

روش رنگ سنجی MTT

MTT یک روش کمی اسپکتروفوتومتری غیر رادیواکتیو برای تعیین تکثیر سلولی، حیات سلولی و تعیین سمیت داروها است. این روش، یک روش رنگ سنجی است که طی آن نمک تترازولیوم (MTT) به یک محصول ارغوانی فورمازان نامحلول تبدیل می‌گردد. این واکنش احیا توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل صورت می‌پذیرد که به عنوان یک مؤلفه رشد و زنده بودن پروماستیگوت‌ها در برابر پاسخ دارویی بکار

یافته‌ها

جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره جلبک قهوه‌ای و گلوکانتیم و میزان زنده‌بودن (Viability) پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) به‌منظور یافتن IC50 توسط تست MTT بررسی شد. تست MTT یک آزمون رنگ‌سنجی که جهت بررسی پرولیفراسیون سلول‌ها به کار گرفته و نحوه عمل آن سنجش تبدیل رنگ تترازولیوم MTT به کریستال‌های فورمازان توسط سلول‌های زنده می‌باشد. اثرات ضد *لیشمانیایی* (IC50) عصاره جلبک قهوه‌ای و داروی کنترل گلوکانتیم پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون بر روی رشد پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا اینفانتوم* در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان IC50 عصاره جلبک قهوه‌ای در زمان‌های مختلف، به ترتیب ۸۷/۶ $\mu\text{g/mL}$ ، ۳۵/۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۰ $\mu\text{g/mL}$ برای پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* می‌باشد که این نشان از فعال بودن این عصاره علیه این انگل‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف می‌باشد. به همین ترتیب IC50 های گلوکانتیم برای *لیشمانیا ماژور* به ترتیب زمانی ۹۶/۷۶ $\mu\text{g/mL}$ ، ۴۴/۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۱/۸ $\mu\text{g/mL}$ می‌باشد. غلظت دوز کشنده داروی گیاهی جلبک قهوه‌ای خلیج فارس که در آن تقریباً ۱۰۰٪ سلول‌های *لیشمانیا ماژور* از بین می‌روند، ۵ mg/mL به دست آمد.

سلول‌ها در دور پایین ۱۰۰۰ g سانتیفریوژ و در محلول PBS به‌صورت سوسپانسیون درآمده شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی و حداقل ۲۰ زمینه میکروسکوپی برای هر نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات مورفولوژیک نظیر شکل و حرکت در زمان‌های ۰-۲۴-۴۸-۷۲ ساعت پس از مواجهه با پروماستیگوت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار EXEL درصد viability سلول‌های کنترل و سلول‌های مواجه شده و با دارو با استفاده از این فرمول به دست آمد:

$$\text{Viable Cells\%} = [(AT - AB) / (AC - AB)] \times 100$$

به‌طوری‌که AC جذب نوری سلول‌های کنترل، AT جذب نوری سلول‌های درمان شده با عصاره جلبک قهوه‌ای و گلوکانتیم، AB جذب نوری بلانک می‌باشد. در نهایت نتایج به‌صورت IC50 به‌وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم‌افزار EXEL محاسبه گردید. جذب نوری به‌دست‌آمده به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده و فعال مرتبط است (۲۲، ۲۳).

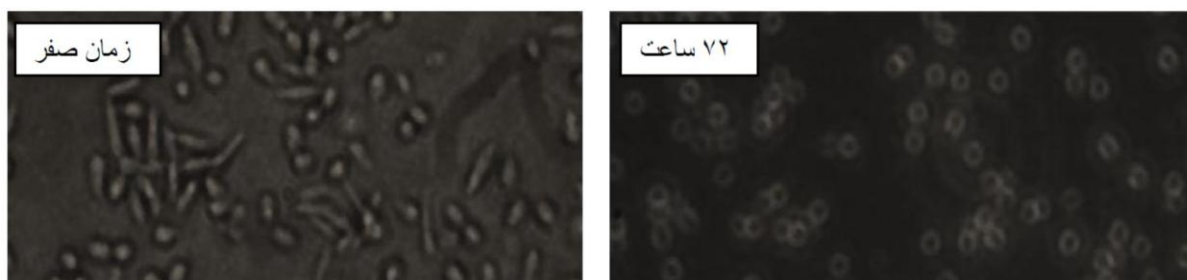
جدول ۱: IC50 های عصاره جلبک قهوه‌ای و داروی گلوکانتیم پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون علیه پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور*

IC50 ($\mu\text{g/ml}$)			نام ترکیب
۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
۸۷/۶	۳۵/۵	۲۰	عصاره جلبک قهوه‌ای
۹۶/۷۶	۴۴/۵	۲۱/۸	گلوکانتیم

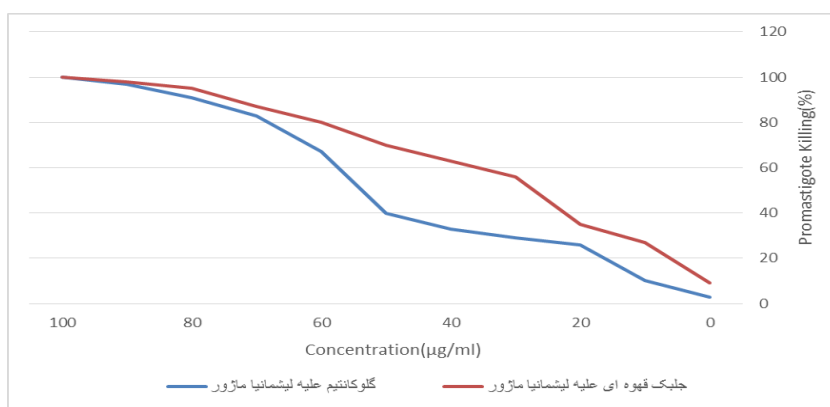
تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌ها

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* مواجهه شده با غلظت ۵ mg/mL (IC50) عصاره جلبک قهوه‌ای بررسی شد که بعد از ۱۰ ساعت مواجهه شدن با عصاره تغییرات بروز کرده و بعد از ۷۲ ساعت تمام سلول‌ها شروع به چروکیدن

(cell shrinkage)، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم (Cytoplasmic condensation) و کوچک‌تر شدن کردند. هیچ‌گونه تغییری در پروماستیگوت‌های کنترل مشاهده نشد.



شکل ۱: تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در زمان صفر و ۷۲ ساعت پس از تیمار شدن با عصاره‌ی جلبک قهوه‌ای خلیج فارس



نمودار ۱: درصد مرگ پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور در غلظت‌های مختلف عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج فارس و داروی گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون

بحث

این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تأکید قرار می‌دهد (۱۳).

جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند و کاربرد غذایی دارند و به‌واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند: آگار، کاراژینان و آلژینات، دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی نیز هستند (۱۶،۱۷).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور به این عصاره حساس هستند و با بالا بردن غلظت عصاره جلبک قهوه‌ای و زمان تیمار شدن انگل‌ها با عصاره میزان اثربخشی نیز بیشتر شده و یک رابطه مستقیم بین میزان غلظت عصاره و اثربخشی آن وجود دارد. همچنین مقایسه IC_{50} بین عصاره و داروی کنترل نشان می‌دهد که اثربخشی این عصاره بر روی لیثمانیا ماژور نسبت به گلوکانتیم کمی بیشتر است.

گونه‌های متفاوت از جنس جلبک سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت بیولوژیکی هستند که پایه آن‌ها قند فوکوز است و پیش‌ازاین خواص مهم ضد باکتریایی نظیر تأثیر

لیثمانیازیس یک عفونت انگلی بوده، این بیماری به اشکال مختلف نظیر ضایعات جلدی (سالک)، احشایی (کالآزار) و جلدی _ مخاطی بروز می‌کند. نوع جلدی به دو شکل اصلی: خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود (۱۴).

در ایران لیثمانیوزیس جلدی یکی از بیماری‌های بومی در اکثر نقاط کشور است و گونه‌های لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا ماژور عامل لیثمانیوزیس جلدی می‌باشند (۶).

سمیت و مقاومت دارویی از مشکلات عمده مرتبط با دارودرمانی بیماری لیثمانیوز می‌باشد. به دلیل کاهش تأثیر داروهای خط اول در درمان لیثمانیوز (مثل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیمون) و هزینه بالا و در دسترس نبودن داروهای خط دوم درمان (مثل آمفوتریسین B و میلتفوسین) بسیاری از محققین بر آن شدند تا جایگزین مناسبی برای این دسته از داروها بیابند (۲۶).

با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هرگونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند،

انگل‌های لیشمانیا مورد انتظار بود و نتایج مطالعه حاضر نیز اثربخشی بر روی پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور به صورت برون تنی را نشان داد، لذا انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل لیشمانیا در مدل‌های حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود که این خود بزرگ‌ترین محدودیت این مطالعه می‌باشد چراکه فرم اصلی بیماری‌زای این انگل، فرم داخل سلولی (آماستیگوت) آن می‌باشد و برای اینکه این عصاره را به‌عنوان یک ترکیب ضد لیشمانیایی بدانیم نیاز به مطالعات گسترده داریم.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دپارتمان انگل‌شناسی و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل همکاری‌های ایشان تشکر می‌شود. این مقاله بخشی از نتایج حاصل از گرنت پژوهشی کمیته تحقیقات دانشجویی وزارت بهداشت و دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با شماره 31394-01-42-214 می‌باشد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

روی باسیلوس سوبیتیلیس، ضدویروسی علیه هرپس سیمپلکس و ضد سرطانی از نوع روده‌ای نشان داده‌اند (۲۰). همچنین در سال ۲۰۱۲، Stella Mary و همکاران با بررسی اثر عصاره اتانولی جلبک *Sargassum sp* بر روی MCF-7 (سرطان پستان) و Hep-2 (سرطان کبد) در غلظت‌های مختلف (۱۰۰ µg/ml-۳۰۰ µg/ml) نشان دادند که درصد زنده ماندن سلول‌ها با افزایش غلظت کاهش می‌یابد (۲۷).

همچنین در سال ۲۰۱۰ zandi و همکاران اثرات ضد سرطانی جلبک‌های قهوه‌ای *sargassum oligocystum* آب‌های خلیج فارس را بررسی نمودند. در این تست‌ها بهترین اثر سایتوتوکسیکی عصاره جلبک بر روی سلول سرطانی انسانی Daudi به مقدار ۵۰۰ µg/mL می‌باشد و بروی سلول‌های سرطانی K562 به مقدار ۴۰۰ µg/mL می‌باشد. بنابراین امروزه می‌توان از داروهای گیاهی و عصاره آن‌ها بخصوص عصاره جلبک قهوه‌ای با اثرات جانبی کمتر را جایگزین داروهای شیمیایی ضد سرطانی با اثرات جانبی زیاد کنیم (۲۸).

با توجه به این‌که عصاره جلبک قهوه‌ای اثر مطلوبی بر سلول‌های سرطانی دارد و همچنین انگل‌های لیشمانیا دارای میتوکندری بزرگ و فعال هستند، لذا اثرات این ترکیب بر

References

- Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Ageacquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology* 1999; 119(3): 247-257.
- Saki J, Meamar AR, Oormazdi H, Akhlaghi L, Maraghi S, Mohebbi M, et al. Mini-Exon genotyping of leishmania species in Khuzestan province, southwest of Iran. *Iran J Parasitol* 2010; 5(1): 25-34.
- Desjeux P. Leishmaniasis. current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-318
- Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(2): 126-30.
- Costa LE, Goulart LR, Pereira NC, Lima MI, Duarte MC, et al. Mimotope-Based Vaccines of *Leishmania infantum* Antigens and their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. *Pols One*. 2014; 9(10): 1-13.
- Nadeem A, Javadian E, Seiedi-Rashti A. Epidemiology Leishmaniasis in Iran: in *Leishmania and Leishmaniasis*. Tehran: Tehran university publication center; 1994. p176-200.
- Ahmadi K, Mahmoudzadeh PA, Esfahani AA. Effect of garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of nitric oxide. *Iran J Med Sci* 2002; 27: 97-100.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 399-410.
- Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 2007; 5(3): 150-8
- Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002; 8(4): 319-42.
- Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 2009; 80(2): 81.
- Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania parasitised RAW 264.7 cells*. *Phytochemistry* 2005; 66(17): 2056-71.

13. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi ML, et al. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *J Ethnopharmacol* 2005;102(2):185-90.
14. Rates S M. plant as source of drugs. *Toxicol* 2007; 39(5):603-13.
15. Abbasi N, Azizi F, Abdi M, Saifmanesh M. A Comparative Study of the Antimicrobial Effect of *Scrophularia striata* Boiss. Extract and Selective Antibiotics Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Plants* 2007; 1(Sup3):10-18.
16. Kotnala S, Garg A, Chatterji A. Screening for the presence of antimicrobial activity in Few Indian seaweeds. *Pertanika J Trop Agric Sci* 2009; 32(1):69-75.
17. Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African J Biotechnol* 2007;6(24):2746-51.
18. Barsanti L, Gualtieri P. *Algae anatomy, biochemistry and biotechnology*. New York: Taylor and Francis Group; 2006.
19. Yeh ST, Lee CS. and Chen J C. Administration of hot water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20: 332-345.
20. Zhuang C, Itoh H, Mizuno T. Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). *Biosci Biotechnol Bi* 1995;59: 563– 567.
21. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademyatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against *Leishmania major* promastigotes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2012; 50(3):233–6.
22. Khademyatan S, Adibpour N, Eskandari A, Rezaee S, Hashemitabar M, Rahim F. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol* 2013; 135(2):208–16.
23. Khademyatan S, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Samadikuchaksaraei A, Mousavizadeh K, Hadighi R, Saki J. Induction of apoptosis by miltefosine in Iranian strain of *Leishmania infantum* promastigotes. *Iran J Parasitol* 2009; 4 (2): 23-31.
24. Poorrajab F, Ardestani SK, Foroumadi A, Emami S, Kariminia A, Behrouzi- Fardmoghadam M. et al. Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against *Leishmania* species. *Exp Parasitol* 2009; 121, 323-30.
25. Khademyatan S, Saki J, Gharavi MJ, Rahim F. *Allium sativum* extract induces apoptosis in *leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. *J Med plants Res* 2011; 16:3725-32.
26. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19, 111-26.
27. Stella Mary J, Vinotha P, Andrew M. Pradeep. Screening for in vitro Cytotoxic Activity of Seaweed, *Sargassum* sp. Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13(12):6073-6076.
28. Zandi K, Ahmadzadeh S, Tajbakhsh S, rTastian Z, Yousefi F, Farshadpour F, Sartavi K. Anticancer activity of *Sargassum oligocystum* water extract against human cancer cell lines. *Eur Rev Med. Pharmacol Sci* 2010; 14: 669-673.